

RANKL-RANK 信号传导与破骨细胞生成及骨病

奚正德 胡峻熊

中图分类号: R336 , R589.5 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2008)04-0285-09

摘要: 全球范围内有数亿人口患有骨质疏松和类风湿性关节炎等与骨相关的疾病。对骨代谢发生分子机制的理解对于开发、研制治疗这些疾病的新药十分必要。遗传实验显示, 核因子- κ B 受体性活化因子(receptor activator of NF- κ B , RANK), 其配体 RANKL 和诱饵受体 OPG 是破骨细胞发育和功能活化的关键调节物, 这些研究结果是我们理解骨性疾病的一个重要转折点。RANKL-RANK 信号传导可以激活破骨细胞发育所需的一系列下游信号途径。再者, 在正常生理和疾病过程中, RANKL-RANK 和其他配体-受体系统间的分子交叉串扰(cross-talk)精确调节着骨的动态平衡(homeostasis)。设计靶向针对破骨细胞中 RANKL-RANK 和他们的信号传导途径的药物可以成为革新许多治疗与骨丢失相关疾病(诸如关节炎、牙齿脱落、癌症转移或骨质疏松等) 的新方法。

关键词: 破骨细胞生成; RANKL; RANK; 信号传导; 骨性疾病

Role of RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone diseases XI Zhengde , HU Junxiong .

Shanghai Institute of Immunology , Shanghai Jiaotong University School of Medicine , Shanghai 200025 , China

Abstract: World-widely , hundreds of millions of people are suffered from the bone-related diseases , such as osteoporosis and rheumatoid arthritis . To understand the molecular mechanisms of bone metabolism are crucial for developing new drugs to treat such diseases . In particular , genetic experiments have shown that the receptor activator of NF- κ B (RANK) , its ligand (RANKL) , and the decoy receptor (osteoprotegerin , OPG) are the key regulators for osteoclast development and their functioning . These research data are the important turning-points for our understanding on the bone diseases . RANKL-RANK signal transduction can activate a variety of downstream signaling pathways that are required for the development of osteoclasts . Moreover , in the normal physiology and disease conditions (processes) , cross-talks between RANKL-RANK and other ligand-receptor systems finely tune the homeostasis of bone . Designing the drugs targeting RANKL-RANK and their downstream signal pathways in osteoclasts could be potentially innovating the treatment of the bone loss in the diseases , such as arthritis , tooth loss , cancer metastasis or osteoporosis .

Key words: Osteoclastogenesis ; RANKL ; RANK ; Signaling ; Bone disease

1 概述

通过成骨细胞(osteoblast)合成骨基质和通过破骨细胞(osteoclast)吸收骨质, 骨不断进行着重塑过程。炎症细胞因子、生长因子和激素的扰动可以引起破骨细胞和成骨细胞间活性的不平衡, 这会导致诸如骨质疏松(osteoporosis)和骨硬化(osteopetrosis)

的骨骼异常。骨质疏松是一种以骨密度降低为特征的破坏性疾病, 通常见于老年人群(尤其是女性), 制动患者或甚至是经历零重力的航天员, 并最终会导致骨折的发生。相对照, 骨质硬化或骨密度升高主要出现于罕见的遗传性疾病。

对参与控制破骨细胞和骨质疏松的因子的发现推动了我们对于骨代谢的认识和对骨的研究。这些因子是: NF- κ B 受体性活化因子(RANK), 其配体 RANKL 和 RANKL 的诱饵受体-骨保护蛋白(osteoprotegerin , OPG)。RANKL 与其受体 RANK 结合对驱动破骨细胞从造血前体细胞的发育并活化为

作者单位: 200025 上海, 上海交通大学医学院上海市免疫学研究所(奚正德); 上海联合赛尔生物工程有限公司(胡峻熊)

通讯作者: 奚正德 , Email : xizhengde@126.com

成熟的破骨细胞提供了关键的信号。OPG 可以阻断 RANKL 与 RANK 的结合,因起着负调节作用,并因此抑制由破骨细胞介导的骨转换(turnover)。由于在骨质疏松、癌症转移或类风湿性关节炎患者中观察到有破骨细胞活性的增加,因此 RANK-RANKL-OPG 轴已显示出是所有骨性疾病最为相关的治疗靶点^[1]。在发现 RANKL 和 RANK 后的下一个目标应该是阐明(在破骨细胞特异的发育过程中)中继 RANKL-RANK 刺激的下游分子。重要的是:对破骨细胞的研究揭示出了一个全新的 RANKL-RANK 信号传导及与其他途径间的交叉串扰(cross-talk)。笔者将就 RANKL-RANK 信号传导通路在骨代谢中的重要作用进行重点阐述。

2 RANK、RANKL 和 OPG 的基本特征

对参与破骨细胞发育因子的鉴定始于 OPG,作为一种潜在的破骨细胞生成抑制物,OPG 第一个被克隆。它是肿瘤坏死因子受体超家族的一员,在成年人的肺、心脏、肾脏、肝脏、脾脏、胸腺、前列腺、卵巢、小肠、甲状腺、淋巴结、气管、肾上腺、睾丸和骨髓中高度表达。分子结合实验显示 OPG 与 RANKL 相关,并作为诱饵受体起抑制作用。RANKL 的受体是 RANK(一种起初被克隆自树突状细胞的 I 型跨膜蛋白)。虽然 OPG 以二聚体形式发挥作用,但 RANK(象肿瘤坏死因子超家族的其他成员一样)可以组装成功能性的三聚体。RANK 在骨骼肌、胸腺、肝脏、大肠、小肠、肾上腺、破骨细胞、乳腺上皮细胞、前列腺和胰腺中被广泛表达。

4 个研究小组几乎同时独立地克隆了 RANKL(作为一种凋亡调节因子、一种 RANK 的配体和一种 OPG 的结合对应物)。RANKL 基因可以形成剪接性变异体(splice variant),编码两种形式的 II 型跨膜蛋白和一种形式的分泌蛋白。虽然在淋巴结、胸腺和肺脏中可以发现有 RANKL 的高表达,但在脾脏、骨髓、外周血、白细胞、心脏、胎盘、骨骼肌、胃或甲状腺中只可以检测到低水平的 RANKL。此外,在怀孕期的乳腺上皮细胞、活化的 T 细胞和恶性肿瘤细胞中, RANKL 的表达也被诱导产生。

3 RANK、RANKL 和 OPG 在体内的作用

RANKL 和 RANK 在体内的一个基本的作用是通过破骨细胞调节骨转换。重组 RANKL 和针对

RANK 基因细胞外结构域的激活性抗体可以刺激 RANK,并因此促进破骨细胞生成。破坏了 RANKL 或 RANK 基因的小鼠由于破骨细胞完全缺失而显示出严重的骨硬化和出牙(tooth eruption)缺陷。这些遗传实验证实 RANKL 和 RANK 是破骨细胞发育和活化的基本条件。相对应地,缺乏 OPG 的小鼠由于破骨细胞的数量和活性的增高出现骨质疏松。与小鼠模型相一致,在患有骨性疾病的患者中已发现有 RANK 和 OPG 的突变。例如,在 4 个有家族性骨质溶解(familial osteolysis)或家族性 Paget 病(familial Paget disease)家庭的受累成员中发现 RANK 的第一个外显子中有二个杂合插入突变。一个突变是有一个 18 碱基的重复,另一个是有一个 27 碱基的重复,二者都影响了 RANK 分子的信号肽区域,同时引起 RANK 介导的 NF- κ B 信号传导的增加,导致骨质溶解和骨重塑增加^[2]。

幼年性 Paget 病(一种常染色体隐性骨病)的特征是网状原始骨(编织样新生骨, woven bone)的重塑加快、骨量减少、骨折和进行性骨骼畸形。可以成为原因的 OPG 区域约有 10 万个碱基对的纯合性缺失已在 2 个患有幼年性 Paget 疾病的患者中发现^[3]。这两个患者有碱性磷酸酶活性(骨转换失调的一个指标)升高。OPG 也在特发性磷酸酯酶过多症(idiopathic hyperphosphatasia, 一种常染色体隐性骨病,其特征是长骨畸形、脊柱后突和髌臼突出),在整个青春期,受累儿童病情迅速进展、加重。3 个受累的同胞 OPG 第 3 个外显子有纯合的碱基对框内缺失,这导致了一个天冬氨酸残基的丢失并使 OPG 功能失活^[4]。这些证据证实:在骨代谢中, RANKL-RANK 和 OPG 的作用(起初由小鼠遗传确定)与人类的疾病有直接的相关性。

除了对破骨细胞的局部调节外,一个惊人的发现是:在 T 细胞活化时, RANKL 在 T 细胞上的表达被上调。因此,已有猜测: RANKL-RANK 对 T 细胞和树突状细胞间的相互作用可能具有重要的调节作用,并可能调节着 T 细胞依赖的免疫应答。然而,树突状细胞(起初被发现 RANK 的细胞)对诱导 T 细胞增殖的功能是正常的。再者, RANK 刺激对小鼠实验性自身免疫性心肌炎不是必需的。有趣的是: RANKL 缺失的小鼠没有淋巴结;给予 RANK-Fc(一种由 RANK 的细胞外结构域和免疫球蛋白 Fc 段组成的融合蛋白)来阻断 RANKL 的活性能保护小鼠不

会因败血症 (sepsis) 诱导引起死亡。这些资料提示: RANKL 在淋巴结器官的发生中具有关键作用, 同时 RANKL 在单核细胞功能活化和在介导炎症反应中具有作用。

没有预测到的是: RANKL 和 RANK 的遗传灭活揭示出了一些惊人的全新功能。在怀孕阶段, 缺乏 RANKL 或其受体 RANK 的小鼠其乳房的小叶小泡结构 (lobulo-alveolar mammary structure) 受到损害, 这导致了新生小鼠的死亡。怀孕中, 乳腺上皮细胞表达 RANKL 受性激素和/或孕激素诱导, 并刺激组成性表达 RANK 的乳腺上皮细胞的增殖^[5]。因此, RANKL 和 RANK (骨骼钙释放的控制性调节者) 对受性激素和/或孕激素诱导的泌乳乳腺 (lactating mammary gland) 形成也是必要的。RANKL 和 RANK 与性和/或孕激素的联系为激素调节骨代谢和骨质疏松中的性偏向提供了一种解释的原理。有趣的是 RANKL 和 RANK 也可能影响心血管系统, 这可能是由于骨转换增高并导致钙稳态改变的所致。例如, OPG 缺失的小鼠显示有中等程度的主动脉和肾血管的钙化^[6]。再者, 一个带有 OPG 突变的患者患有心力衰竭^[3]。这些小鼠的和人体的资料提示: OPG 或其配体 RANKL 的失调可以解释长期观察到的骨质疏松和心血管缺陷之间有相互作用的原因。

4 RANKL 表达的调节

由于 RANKL 是 RANK 的唯一已知配体, 并且 RANKL 和 RANK 在骨代谢、免疫系统中淋巴结的形成和怀孕期乳腺的发育中具有关键作用, 因此, 理解在正常和疾病状态下 RANKL 表达是如何被调节的就显得很重要。具有刺激 RANKL 表达的一些因子的功能已在一些文献中得到详细描述过^[7,8]。简单讲, 甲状旁腺激素、前列腺素 E_2 、地塞米松、炎症性细胞因子 (诸如 IL-1、TNF- α) 或 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 可以刺激 RANKL 表达。相对照, 雌激素或转化生长因子 (TGF- β) 可以减弱 RANKL 的表达。值得注意的是: OPG 和 RANKL 二者的表达通常被这些因子反向调节。在恶性肿瘤细胞中, RANKL 表达也是被上调的, RANKL 参与了癌症中的骨破坏。因此, 癌症、许多细胞因子和激素的失调可以通过 RANKL 的表达来调节骨转换。

有假设认为: 可溶形式的 RANKL (sRANKL) 具有更为强大的活性, 在肿瘤诱导的骨质溶解

(osteolysis) 中具有重要作用。sRANKL 来自膜型分子的蛋白酶水解或不同的剪接。蛋白酶水解 RANKL 需要一种解聚素和金属蛋白酶结构域 (a disintegrin and metalloprotease domain, ADAM) 家族成员和基质金属蛋白酶 (matrix metalloprotease, MMP)。例如, 在体外, ADAM17 (也称 TACE) 和 ADAM19 已显示能切割 RANKL。在肿瘤-骨交界面, 由成骨细胞表达的 MMP-3 和由破骨细胞表达的 MMP-7 可以裂解 RANKL 成为一种可以促进破骨细胞活性的可溶性形式。最近体内的研究工作证实了 RANKL 脱落 (shedding) 酶的重要性和特异性。MMP-7 缺失的小鼠显示出对 RANKL 处理的降低和伴有的前列腺肿瘤诱导骨溶解的降低。相对照: MMP-9 和 MMP-13 在体内都不能处理 RANKL 成为可溶的形式。金属蛋白酶组织抑制剂 (Tissue inhibitors of metalloproteases, TIMP) 能与 MMP 结合, 并因此干扰 MMP 的活性。TIMP-2 已被报道可以控制 RANKL 脱落酶的活性。在小鼠模型中和在由编码 TIMP-3 基因突变引起的人 Sorsby's fundus dystrophy (眼底营养不良) 中的进一步研究可以回答 TIMP 在体内骨代谢中的重要性^[9]。再者, 关于在正常生理和/或疾病状态中膜结合的或可溶性的 RANKL 是否是破骨细胞发育关键调节者尚需进一步研究。

5 RANK 信号传导

RANKL 与 RANK 的结合激发了内在的和不同的信号传导级链, 它们控制着破骨细胞谱系的定向发育和活化。由于 RANKL 和 RANK 在体内有多种作用, 已有大量工作用于研究鉴定破骨细胞的特异性信号传导通路, 以期能理解 RANK 的信号传导。RANK 诱导的信号级链及信号分子与骨性疾病的关系, 见图 1。

膜结合性 RANKL 或被 MMP 或 ADAM 切割的可溶性 RANKL (sRANKL) 结合并活化受体 RANK。RANK 刺激通过转接分子 (诸如 TRAF 和 Gab 2) 诱导 NF- κ B、MAPK 和磷脂酰肌醇途径以控制破骨细胞生成。NF- κ B-Rel 活化通过经典的 TAK1-IKK β 或非经典的 NIK-IKK β 发生, 这会导致在启动子区含有 κ B 结合位点靶基因的转录性调节。MAPK 家族成员控制着 AP1 家族成员 (诸如 JUN、FOS 和 FRA) 这调节着破骨细胞生成必需的重要基因的表达。磷脂酰肌醇途径受各种脂类激酶和磷酸酶协同作用调节, 这

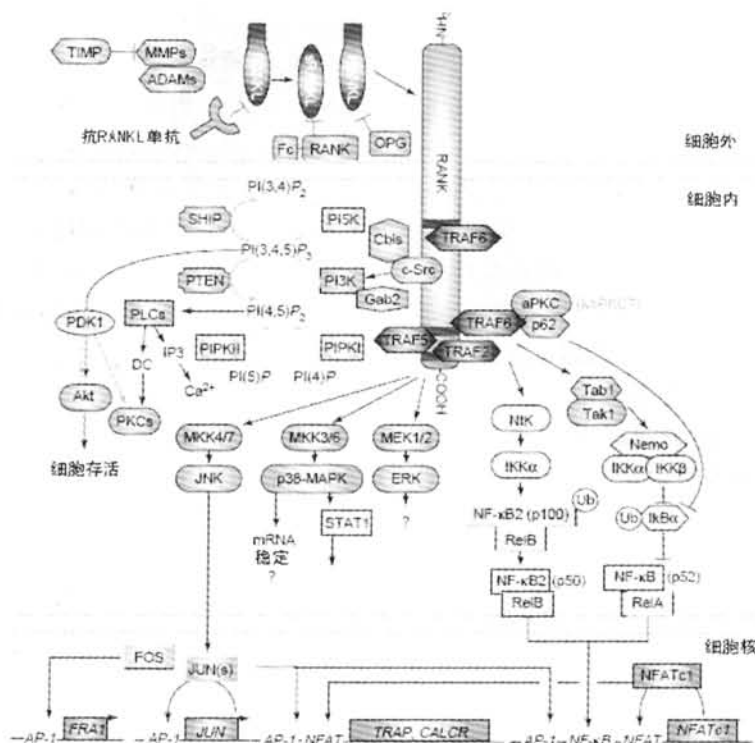


图1 RANKL-RANK 诱导控制破骨细胞谱系定向发育和活化的信号传导级联

导致了 Akt 和 PKC 的活化。IP 3: 肌醇 (1,4,5)-三磷酸盐; PI3K: PtdIns4P 5-激酶; RelA/B: rel 鸟类网状内皮细胞增殖病毒致癌基因同系物 A/B。

5.1 NF-κB

刺激 RANK 可以导致强的 NF-κB 活化。各种 TNF 受体相关因子 (TNF-receptor associated factor, TRAF) 蛋白与 RANK 的细胞浆结构域相关, 并将 RANK 刺激中继给 NF-κB。特别是: 遗传研究已显示 TRAF 对破骨细胞的形成和破骨细胞的活化是必需的^[10,11]。缺乏 NF-κB p 50 和 p 52 蛋白都会使小鼠出现骨硬化^[12]。介导 NF-κB 活化的上游亚单位 (由催化亚单位 IKKα 和 IKKβ 及非催化亚单位 IKKγ, 也称 NEMO 组成) 对 RANKL-RANK 信号传导和破骨细胞的生成也极为重要。在 小鼠中, IKKβ 在体内和体外对 RANKL 诱导的破骨细胞生成是必需的; 然而, IKKα 显示出只在体外而不是体内所必需^[13]。重要的是: 患有 X 连锁的骨硬化、淋巴水肿、先天性外胚层缺陷和免疫缺陷 (osteopetrosis, lymphedema, anhidrotic ectodermal dysplasia and immunodeficiency, OL-EDA-ID 综合征) 的患者带有 IKKγ (NEMO) 基因中的 X 420 W 点突变, 并有骨硬化^[14]。因此, RANKL-RANK 通过 NF-κB 途径调节破骨细胞发育和

破骨细胞功能化不只存在于小鼠, 也在人类中存在。

5.2 MAPK

丝裂原活化的蛋白激酶 (mitogen activated protein kinase, MAPK) 家族成员由 p 38-MAPK (p 38-MAPKα, β, γ 和 δ)、c-Jun N 端激酶 (JNK 1, 2 和 3)、细胞外信号调节的激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK 1 和 ERK 2) 和大 MAPK (ERK 5, ERK 7 和 ERK 8) 组成。这些激酶中的许多激酶在 RANK 的下游被激活, 并能中继 RANK 刺激以引起细胞应答。例如, 使用 p 38-MAPKα 和 p 38-MAPKβ 的特异性抑制剂 SB 203580, 已发现这二种激酶参与了由 RANKL 介导的破骨细胞生成^[15]。RANK 下游活化的 p 38-MAPK 可以直接磷酸化 STAT 1 (signal transducer and activator of transcription 1, 转录的信号转导因子和活化因子 1), 并因此控制许多靶基因的表达。p 38-MAPK 的一个主要功能是控制 mRNA 的稳定; 因此, 发现其他转录后 p 38-MAPK 的作用靶点极有意义。

除了 p 38-MAPK 外, JNK (也称 SAPK, 应急活化的蛋白激酶, stress activated protein kinases) 和他们直接的上游激酶 MKK 7 已被发现参与了体外细胞培养中的破骨细胞生成^[16,17]。然而, JNK 1 或 JNK 2 缺

失的小鼠在体内都没有显示出明显的骨缺陷。这可以解释为 JNK 2 代偿了 JNK 1 或者倒过来(JNK 1 代偿了 JNK 2)。由于同时缺失 JNK 1 和 JNK 2 的小鼠在中孕期出现胚胎的致死性,因此,条件性基因去除系统可以用于回答 JNK 对体内破骨细胞生成中的作用。在 JNK 控制下的 AP-1 转录因子也参与了受 RANK 调节的破骨细胞生成。AP-1 家族成员 c-Jun、JunB、c-Fos 和 Fra 对有效的破骨细胞生成是必需的^[18,19]。ERK 在 RANK 刺激时也被活化。然而,用 PD 98059 或 U 0126 抑制 MEK(ERK 的激酶)不能减弱破骨细胞的分化,反而可以提高破骨细胞生成^[20]。由于 NF- κ B 和 MAPK 途径在许多器官中的许多不同受体是共用的,因此这些信号传导分子是否可以成为治疗骨丢失的靶点尚待研究。

5.3 NFATc1

RANK 的刺激可以通过 AP-1 和 NF- κ B 转录因子诱导各种基因的表达。应用 DNA 微阵列技术,钙调神经磷酸酶依赖的活化 T 细胞核因子 1(nuclear factor of activated T cells, calcineurin-dependent 1, NFATc 1, 也称为 NFAT 2)作为一种 RANK 下游的靶点已得到鉴定^[21]。在 RANKL 存在时, NFATc 1 的表达升高,并引起破骨细胞的终末分化。NFATc 1 与 c-Fos 协同促进了诸如 TRAP(tartrate-resistant acid phosphatase, 耐酒石酸盐酸性磷酸酶)和降钙素受体(calcitonin receptor)等破骨细胞特异性基因的表达。在体外使用胚胎干细胞的破骨细胞分化实验中, NFATc 1 缺失的细胞表现出破骨细胞生成的缺陷^[21]。再者,一种活性形式的 NFAT 可以重建在 Fos 缺陷细胞中观察到的破骨细胞生成的损伤^[22]。因此, NFATc 1 是一种连接 RANK 信号传导以引起破骨细胞分化的基本效应分子。鉴于 NFAT 对成骨细胞和骨的形成、控制淋巴细胞活化和心脏瓣膜发育也有重要作用,他们是否能成为阻断过度骨吸收特异药物的理想靶点尚需研究。

5.4 Src 激酶

在鉴定出 RANK 以前,已知道靶向破坏 c-src 原癌基因可以引起小鼠出现骨硬化^[23]。许多年后,发现 c-Src 在 RANK 诱导的抗凋亡性丝氨酸/苏氨酸激酶 Akt/PKB 的活化中具有重要作用。c-Src 和 TRAF 6 相互作用,并在受体衔接后与 RANK 作用。依次地, TRAF 6 提高了 c-Src 的激酶活性,导致下游信号传导分子(诸如 Cbl)的酪氨酸磷酸化。Src 不是唯独

在 RANK 信号传导中起作用,它对黏附诱导的整合素刺激后破骨细胞的功能化也是必需的^[24]。Src 与 Pyk 2、Cbl 和 ADAP 形成一种复合物,并且促进他们磷酸化(是整合素调节的破骨细胞功能化的一个必需条件)。虽然,没有其他 Src 家族成员可以在功能上代偿破骨细胞中 c-Src 功能的丢失,但这种补偿在其他组织中是存在的。因此, c-Src 在破骨细胞中的基本功能是可使 c-Src 作为一个特异抑制剂的靶点,用于治疗骨质疏松和在关节炎中升高的骨吸收。

5.5 转接蛋白(adaptor protein)

TRAF(TNF 受体相关因子)是细胞浆的转接蛋白,它们可以结合到多种 TNFR 家族的细胞内结构域上。TNFR 超家族成员 RANK 含有 3 个 TRAF 结合结构域。应用 RANK 细胞内结构域的去突变(deletion mutation)的研究结果发现: RANK 的每个 TRAF 结合结构域对 TRAF 2、5 和 6 具有不同的亲和力。TRAF 在 RANKL-RANK 信号传导中的一个重要作用是活化 NF- κ B。现已假设: TRAF 6 只介导经典(canonical) NF- κ B 活化途径。要活化下游分子, TRAF 6 需形成一种包含有 RANK 和 TAK 1 结合性蛋白 χ (TAK1 binding protein 2, TAB 2)的信号传导复合物,这种复合物随后导致 TAK 1(transforming growth factor- β -activated kinase 1, TGF- β 活化的激酶 1)的活化。相对照, TRAF 2 和 TRAF 5 可以激活经典的和非经典的 NF- κ B 途径。TRAF 3 具有一种不同的作用,并对 TNFR 家族介导的 NF- κ B 活化起负调节作用。

在 TRAF 中, TRAF 6 是 RANKL-RANK 诱导的破骨细胞生成最重要的转接蛋白。RANK 中的 TRAF 6 结合区域对 RANK 诱导的 NF- κ B 活化和体内破骨细胞的生成是必要的。重要的是: TRAF 6 缺失的小鼠可以发展出严重的骨质硬化^[10]。相对照, TRAF 2 和 TRAF 5 对破骨细胞生成的贡献很小。例如,胎肝来源 TRAF 2 缺失的前体细胞只显示有轻度(20%)的多核破骨细胞减少, RANKL 对 NF- κ B 和 JNK 的活化程度相差不多。TRAF 5 缺失的细胞也显示有轻度的多核破骨细胞减少,而且,在 RANK 刺激时 NF- κ B 或 JNK 的活化都没有受到明显影响。因此, TRAF 6 似乎是 RANK 信号传导的主要转接分子。

最近,发现的另一种转接蛋白分子对 RANK 信号传导具有重要作用。Grb 2 相关结合物 2(Grb 2 associated bindetr 2, Gab 2)介导了 RANK 诱导的 NF-

κ B, Akt 和 JNK 的活化。小鼠中,遗传灭活 Gab 2 可以导致由于破骨细胞分化缺陷而引起的骨质硬化和骨吸收下降^[25]。在人外周血来源的前体细胞中通过使用 siRNA 灭活 Gab 2 的研究显示:Gab 2 对破骨细胞生成的贡献不但与小鼠而且也与人类相关^[25]。虽然,发展出对抗转接蛋白的小分子抑制剂还有困难,但是,这些转接分子已确切被认为可以作为破骨细胞特异性靶点来治疗骨丢失。

5.6 磷脂酰肌醇代谢 (phosphatidylinositol metabolism)

肌醇脂代谢 (inositol lipid metabolism) 在 RANK 信号传导中的重要性也不容忽视。Src 活化 Akt 需要能生成磷脂酰肌醇(3,4,5)-三磷酸盐 [PtdIns(3,4,5)P₃] 的脂类激酶-磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI 3-激酶) 和磷脂酰肌醇依赖的蛋白激酶 1 (phosphoinositide-dependent protein kinase 1, PDK 1)。使用 PI 3-激酶阻断剂 Wortmannin 的实验表明:PI 3-激酶的抑制可以导致破骨细胞性骨吸收的损害^[26]。相对照, PDK1 在 RANK-RANKL 信号传导中的参与作用尚未见报道。

PtdIns(3,4,5)P₃ 的产生受两种脂磷酸酶:磷酸酶和张力蛋白同源物 (PTEN) 和 SH 2 含有性肌醇磷酸酶 I (SHIP 1) 负调节。PTEN 和 SHIP 1 是磷酸肌醇 (phosphoinositide) 3'-和 5'-磷酸酶,它们可以从 PtdIns(3,4,5)P₃ 上去除一个磷酸残基而分别产生 PtdIns(4,5)P₂ 和 PtdIns(3,4)P₂。PTEN 过表达可以抑制 RANKL 介导的破骨细胞的分化,并且显性负向形式 (dominant-negative form) 的 PTEN 过表达在体外能组成性诱导破骨细胞分化^[27]。但是,还没有遗传证据证实 PTEN 在体内破骨细胞生成中具有重要的作用。例如,现在还不清楚在 Cowden 疾病 (由 pten 基因的胚系突变引起) 中 RANKL-RANK 信号传导和骨代谢是否受影响。相对照, SHIP 1 在破骨细胞生成中的重要性已在体内和体外显示。在体外,破骨细胞培养显示:在 SHIP 1 缺陷细胞中,破骨细胞生成是提高的,这些细胞对 RANKL 和克隆刺激因子-1 (CSF-1, M-CSF) 的刺激产生过度反应^[28]。重要地, SHIP 1 缺陷小鼠有骨质疏松^[28]。再者,和 Paget 氏病 (一种特征为破骨细胞活性改变的遗传性疾病) 相似,在 SHIP 1 缺陷小鼠中血清 IL-6 的水平明显升高^[28]。因此,5' 脂磷酸酶 SHIP 1 似乎是 RANKL-RANK 诱导的破骨细胞分化的关键负调节者。

磷酸肌醇特异的磷酸脂酶 C (phosphoinositide-specific phospholipase C, PLC) 是另一种磷酸肌醇相关的酶,它能催化 PtdIns(4,5)P₂ 水解产生第二信号分子肌醇(1,4,5)-三磷酸盐 [Ins(1,4,5)P₃] 和甘油二酯 (diacylglycerol)。RANKL 通过 PLC 从细胞内贮存库中释放出 Ca²⁺ 而起作用。随后, Ca²⁺ 水平升高通过钙调神经磷酸酶 (calcineurin) 激活基本的转录因子 NFATc 1^[29]。重要地, RANK 活化 PLC γ 需要蛋白酪氨酸激酶 Syk 和带有免疫受体酪氨酸活化基序 (immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM) 的分子 [诸如 DNAX 激活蛋白 (DAP 12) 和 Fc 受体共有的 γ 链 (Fc γ)]^[29]。虽然,在脂类信号传导中已有很好的工作完成,但对 RANKL-RANK 信号传导来说,很大程度上仍是一个未被开发的领域。例如,从 RANK 信号传导和破骨细胞生成角度研究缺失脂激酶 [诸如 PtdIns 4 P 5-激酶 (PIPKI) 和 PtdIns 5 P 4-激酶 (PIPKII)]、脂磷酸酶或脂相关分子的突变小鼠模型应该是一项很有趣的工作。

5.7 蛋白激酶 C (PKC)

RANK 刺激和受 RANK 调节的骨代谢必需依赖于钙信号传导。与活化钙调神经磷酸酶-NFATc 1 途径一样, Ca²⁺ 也能活化蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 蛋白。已有研究显示:非典型 PKC (atypical PKC, aPKC) 相互作用性蛋白 p 62 在 RANKL 诱导的破骨细胞生成期间是上调的,并形成一种三分子 (ternary) 复合体 (包括 TRAF 6 和 aPKC)。在小鼠中遗传灭活 p 62 在体内体外可以导致破骨细胞生成的损害^[30]。重要地,在人编码 p 62 的基因中的突变是引起 5 q 35-相连的 Paget 氏病的原因^[31]。在 aPKC 中, λ /aPKC 可能是参与破骨细胞生成的激酶,因为小鼠缺失另一种 aPKC-PKC ζ 在体外没有显示出破骨细胞生成损害的外显表型^[30]。对 λ /aPKC 条件性敲除小鼠的进一步分析应可以回答这一问题。

6 与其他途径分子的交叉串扰 (cross-talk)

虽然 RANKL-RANK 信号传导对破骨细胞生成是必需的,但同时与其他信号传导分子的交叉串扰精细调节着破骨细胞生成和由此引起的骨转换。例如, RANKL 被表达在活化的 T 细胞上,但 T 细胞也产生一种与 RANK 信号传导干扰的因子。其中一种 T 细胞来源的分子被发现是 γ -干扰素 (interferon- γ , IFN- γ)。在分子水平上, IFN- γ 通过泛素-蛋白酶体

系统促进 TRAF6 的加速降解^[32], 因此, $\text{IFN-}\gamma$ 减低了 RANK 信号传导^[33]。这条途径在人类免疫缺陷病毒血清阳性的患者中具有临床相关性。AIDS 患者显示出骨吸收加快, 在接受高度积极抗逆转录病毒疗法(加入了某种蛋白酶抑制剂)的患者中骨吸收的发生率极大提高。其中一些蛋白酶抑制剂可以阻断 TRAF 6 降解, 这引起 RANKL 和 $\text{IFN-}\gamma$ 受体间的交叉串扰作用减弱, 并因此提高了 RANK 的信号传导^[34]。此外, HIV 蛋白也可以转录性诱导 RANKL 表达^[34]。T 细胞来源的 RANKL 对类风湿性关节炎中的骨破坏具有重要作用。有趣的是, 关节炎中 T 细胞浸润的区域只表达非常低水平的 $\text{IFN-}\gamma$, 这也许可以解释类风湿性关节炎中 T 细胞可以激发局部破骨细胞生成和骨丢失的原因。除了 $\text{IFN-}\gamma$ 受体信号传导外, $\text{IFN-}\beta$ 也参与了 RANKL-RANK 介导的破骨细胞生成的交叉串扰。RANKL-RANK 可以通过 c-Fos(一种对破骨细胞形成的关键性转录因子)诱导 $\text{IFN-}\beta$ 。然后, 分泌的 $\text{IFN-}\beta$ 作为负反馈调节关闭 c-Fos 蛋白表达^[35]。因此, 调变干扰素系统和受干扰素调节的信号传导途径(RANKL-RANK)可以被利用来治疗骨性疾病。

性激素与骨病紧密联系。例如, 停经后的妇女, 由于她们的卵巢停止产生雌激素, 因此会导致骨量的丢失和老年性骨质疏松的发生。事实上, 性激素(诸如雌激素和雄激素)可以通过下调 JNK-c-Jun 途径抑制 RANKL 诱导的破骨细胞分化^[36]。再者, 雌激素和雄激素能控制诱饵受体 OPG 的表达, 因此改变 RANKL-RANK 信号传导的平衡。事实上, OPG 治疗可以逆转雌性大鼠卵巢切除后破骨细胞数量的增加和骨丢失。JNK-c-Jun 调节是否是体内受性激素调节的骨代谢的另一条途径需要用遗传获救实验(genetic rescue experiments)来证实。

破骨细胞生成受许多细胞因子(包括 CSF-1、IL-1、TGF- α 、TGF- β 、TNF α 、TNF β 、IL-4、IL-6 和 IL-11)的影响。例如, IL-1 和 TNF α 刺激可与 RANK 协同促进破骨细胞生成。从机制上讲, TNFR、IL-1R 和 RANK 可能共享下游信号传导途径(例如, NF- κ B 或 JNK 活化), 这导致分子协同增效。例如, 在类风湿性关节炎患者中, TNF α 抑制可以在受累关节部位通过降低炎症间接和/或直接影响 RANK 信号传导阻碍骨丢失。

带有 ITAM 的分子 DAP 12 和 Fc γ R 对 RANK 介

导的 Ca^{2+} 诱导和破骨细胞生成具有关键作用。重要的是, RANK 可以通过含有 ITAM 的分子激活 PLC γ (随后是钙信号传导)和 NFATc1^[29]。缺乏 DAP 12 和 Fc γ R 二者的小鼠可以降低 RANK 激发的 NFATc1 的诱导, 这会导致破骨细胞分化的严重缺陷^[29]。从机制上讲, Fc γ R 分子与 PIR-A(paired immunoglobulinlike receptor-A, 配对性免疫球蛋白样受体-A)和 OSCAR(OC-associated receptor, 破骨细胞相关受体)相关, 而 DAP 12 分子与 TREM- χ (triggering receptor expressed in myeloid cells 2, 在髓样细胞中表达的激发性受体 2)和 SIRP(signal-regulatory protein β 1, 信号调节蛋白 β 1)相关; 因此, 这些受体通过 Fc γ R 和 DAP 12 分子介导来自成骨细胞的共刺激信号, 它们与 RANK 信号传导协同引起 Ca^{2+} 信号传导和 NFATc1 活化的提高^[29]。成骨细胞对表达在破骨细胞上的 TREM-2 和 SIRP 活化的重要性问题很多有待进一步研究^[37]。

人类中异三聚体 G 蛋白亚 α 单位(α subunit of guanine nucleotide-binding protein, 鸟苷酸结合性蛋白 α 亚单位, GNAS1)的突变是引起多骨性纤维性发育不良(polyostotic fibrous dysplasia, 其特征是高度骨髓纤维化和骨转换率提高)的原因^[38]。骨的缺陷被假设由腺嘌呤核苷酸环化酶(adenylate cyclase)活性升高并随后 c-Fos 表达升高引起。由于 c-Fos 表达受 RANK 信号传导控制, 因此, 通过 G-蛋白耦联受体和 RANK 的整合刺激了 c-Fos 的表达。再者, 组蛋白修饰可能也参与了 RANK 信号传导, 二种组蛋白脱乙酰基酶抑制剂曲古抑菌素 A(trichostatin A)和丁酸钠(sodium butyrate)可以抑制 RANK 介导的 NF- κ B 和 p 38-MAPK 的活化。这些结果提示表观遗传组蛋白修饰对受 RANKL-RANK 调节的破骨细胞谱系的定向分化和可能的破骨细胞活化有作用。

虽然, RANKL-RANK 刺激对破骨细胞生成诱导具有关键作用, 但其他受体和信号传导途径也可以正向和负向调变受 RANK 调节的骨代谢。进一步分析这些平行和交叉串扰途径可以为控制特异存在于破骨细胞中的 RANKL-RANK 信号传导提供全新的策略。

7 潜在的治疗靶点

世界范围内, 骨相关疾病(诸如骨质疏松、类风湿性关节炎或癌症转移)影响了数以百万计的人口。

RANKL 和 RANK 的发现,尤其是经遗传证据显示 RANKL 和 RANK 为体内破骨细胞生成活化所必需,为骨研究和药物开发开辟了一条新途径。虽然诸如 IL-1 和 $\text{TNF}\alpha$ 的细胞因子也已可能作为控制关节炎性骨破坏的潜在性治疗靶点,但 IL-1 和 $\text{TNF}\alpha$ 单独或联合应用在活化的破骨细胞诱导方面要比 RANKL 弱得多。因此,在受体水平和 RANKL-RANK 信号传导水平上控制 RANKL 和 RANK 对治疗系统或局部骨丢失应该是非常合适的方法。尤其是,抑制 RANKL 是一种可以用于开发治疗骨吸收增加新药的合理策略。重组 OPG 和完全人源化的抗 RANKL 阻断性抗体及 RANK-Fc 融合蛋白在体内都能有效阻断 RANKL 和骨吸收。有趣的是,在一种小鼠甲状旁腺激素调节蛋白(PTHrP)介导性骨吸收模型中,与用二膦酸盐(一种当今治疗骨丢失的标准方法)比较,使用 OPG 抑制 RANKL 能较强地抑制骨吸收和引起高钙血症。再者,一种抑制 RANKL 功能的完全人源化抗体已被开发,其显示能抑制 RANKL 的功能,与用 OPG-Fc 蛋白比较,其在体内的半衰期较高。因此,开发这种人源化单克隆性抗 RANKL 抗体(Denosumab,以前称 AMG 162)用于治疗骨质疏松的策略正在进行中。在绝经后骨质疏松的妇女 1 期和 2 期临床试验成功的基础上,使用 Denosumab 的 3 期临床研究也已启动。

除了 RANKL 和 RANK 在骨质疏松中具有关键作用外,RANKL 和 RANK 也可以作为癌症、骨转移、败血症、类风湿性关节炎或牙周炎引起骨丢失的一个治疗靶点。例如,RANKL 在诸如成年性 T 细胞白血病等恶性肿瘤细胞中高度表达,并参与了骨破坏。在多发性骨髓瘤或前列腺和乳腺癌骨转移的恶性骨溶解致病机制中,RANKL 与 OPG 的比例发生改变。因此,抑制 RANKL 对于控制骨肿瘤和相关骨溶解中的骨丢失是一种极有前景的新疗法。在人牙周炎中已观察到,微生物激发并诱导了 RANKL 在 CD4^+ T 细胞上的表达,并随后活化破骨细胞。事实上,在人源化牙周炎的小鼠模型中,使用 OPG 抑制 RANKL 可以明显减低牙槽骨(alveolar bone)丢失。再者,选择性阻断 $\text{Kv}1.3$ (一种参与 T 细胞受体活化的钾通道)可以降低 RANKL/OPG 蛋白表达比例,这与在实验性牙周疾病中炎症性骨吸收减少相关。因此,抑制 RANKL 对预防人类牙周炎中牙槽骨和/或牙丢失会有治疗价值。

另一个最近被提出用于治疗 RANK 相关靶点是抑制 MMP-7。MMP-7(在肿瘤-骨交界面由破骨细胞产生)可以处理 RANKL 生成一种可以促进破骨细胞活化的可溶性分子。因此,抑制 MMP-7 在治疗癌症诱导的骨溶解中应该具有应用价值。虽然,还有其他可以用于干扰破骨细胞成熟和活化的潜在性靶点(诸如激酶、转接蛋白和转录因子等),但靶向细胞外可溶性因子(RANKL)和细胞表面受体(RANK)是目前用于设计骨丢失药物最有前景的途径。

8 结语

RANKL、RANK 和 OPG 的发现及他们在调节破骨细胞发育和活化中作用的研究,已经为用于设计高效和合理治疗与破骨细胞生成相关疾病中的骨丢失新药提出了一些新的可能^[39]。研究结果显示靶向 RANKL(如使用 OPG、RANK-Fc 融合蛋白、人源化 RANKL 单克隆抗体或甚至是 RANKL 疫苗等)可能是治疗骨丢失最有效和相关的方法,但这些药物对其他系统(诸如固有和适应性免疫系统)的潜在副作用仍然值得关注。对破骨细胞特异的 RANK 信号传导途径的阐明也会发现潜在性新药的靶点,针对这些靶点的药物可能在将来用于治疗骨质疏松或在诸如牙周炎或类风湿性关节炎疾病中的局灶性骨丢失,因此对破骨细胞生成相关的信号途径必然会成为未来骨性疾病研究的热点。

【参考文献】

- [1] Tanaka S. Signaling axis in osteoclast biology and therapeutic targeting in RANKL/RANK/OPG system. *Am J Nephrol*, 2007, 27(5):466-478.
- [2] Hughes AE, Ralston SH, Marken J, et al. Mutations in *TNFRSF11A*, affecting the signal peptide of RANK, cause familial expansile osteolysis. *Nat Genet*, 2000, 24(1):45-48.
- [3] Whyte MP, Obrecht SE, Finnegan PM, et al. Osteoprotegerin deficiency and juvenile Paget's disease. *N Engl J Med*, 2002, 347(3):175-184.
- [4] Cundy T, Hegde M, Naot D, et al. A mutation in the gene *TNFRSF11B* encoding osteoprotegerin causes an idiopathic hyperphosphatasia phenotype. *Hum Mol Genet*, 2002, 11(18):2119-2127.
- [5] Fata JE, Kong YY, Li J, et al. The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. *Cell*, 2000, 103(1):41-50.
- [6] Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, et al. osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev*, 1998, 12(9):1260-1268.
- [7] Suda T, Ueno Y, Fujii K, et al. Vitamin D and bone. *J Cell*

- Biochem , 2003 , 88(2) :259-266.
- [8] Walsh MC , Choi Y . Biology of the TRANCE axis . Cytokine Growth Factor Rev , 2003 , 14(3-4) :251-263.
 - [9] Weber BH , Vogt G , Pruett RC , et al . Mutations in the tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3) in patients with Sorsby's fundus dystrophy . Nat Genet , 1994 , 8(4) :352-356.
 - [10] Lomaga MA , Yeh WC , Sarosi I , et al . TRAF 6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1 , CD 40 , and LPS signaling . Genes Dev , 1999 , 13(8) :1015-1024.
 - [11] Poblens AT , Jacoby JJ , Singh S , et al . Inhibition of RANKL-mediated osteoclast differentiation by selective TRAF6 decoy peptides . Biochem Biophys Res Commun , 2007 , 359(3) :510-515.
 - [12] Iotsova V , Caamano J , Loy J , et al . Osteopetrosis in mice lacking NF-kappaB 1 and NF-kappaB 2 . Nat Med , 1997 , 3(11) :1285-1289.
 - [13] Ruocco MG , Maeda S , Park JM , et al . I-kappa B kinase (IKK) {beta } , but not IKK {alpha } , is a critical mediator of osteoclast survival and is required for inflammation-induced bone loss . J Exp Med , 2005 , 201(10) :1677-1687.
 - [14] Doffinger R , Smahi A , Bessia C , et al . X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency is caused by impaired NF-kappaB signaling . Nat Genet , 2001 , 27(3) :277-285.
 - [15] Matsumoto M , Sudo T , Saito T , et al . Involvement of p 38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway in osteoclastogenesis mediated by receptor activator of NF-kappa B ligand (RANKL) . J Biol Chem , 2000 , 275(40) :31155-31161.
 - [16] David JP , Sabapathy K , Hoffmann O , et al . JNK1 modulates osteoclastogenesis through both c-Jun phosphorylation-dependent and -independent mechanisms . J Cell Sci , 2002 , 115(Pt 22) :4317-4325.
 - [17] Yamamoto A , Miyazaki T , Kadono Y , et al . Possible involvement of IkappaB kinase 2 and MKK7 in osteoclastogenesis induced by receptor activator of nuclear factor kappaB ligand . J Bone Miner Res , 2002 , 17(4) :612-621.
 - [18] Kenner L , Hoeberz A , Beil T , et al . Mice lacking JunB are osteopenic due to cell-autonomous osteoblast and osteoclast defects . J Cell Biol , 2004 , 164(4) :613-623.
 - [19] Wagner EF . Functions of AP1 (Fos/Jun) in bone development . Ann Rheum Dis , 2002 , 61(Suppl 2) :ii40-42.
 - [20] Hotokezaka H , Sakai E , Kanaoka K , et al . U0126 and PD98059 , specific inhibitors of MEK , accelerate differentiation of RAW 264.7 cells into osteoclast-like cells . J Biol Chem , 2002 , 277(49) :47366-47372.
 - [21] Takayanagi H , Kim S , Koga T , et al . Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT 2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts . Dev Cell , 2002 , 3(6) :889-901.
 - [22] Matsuo K , Galson DL , Zhao C , et al . Nuclear factor of activated T-cells (NFAT) rescues osteoclastogenesis in precursors lacking c-Fos . J Biol Chem , 2004 , 279(25) :26475-26480.
 - [23] Soriano P , Montgomery C , Geske R , et al . Targeted disruption of the c-src proto-oncogene leads to osteopetrosis in mice . Cell , 1991 , 64(4) :693-702.
 - [24] Miyazaki T , Sanjay A , Neff L , et al . Src kinase activity is essential for osteoclast function . J Biol Chem , 2004 , 279(17) :17660-17666.
 - [25] Wada T , Nakashima T , Oliveira-dos-Santos AJ , et al . The molecular scaffold Gab2 is a crucial component of RANK signaling and osteoclastogenesis . Nat Med , 2005 , 11(4) :394-399.
 - [26] Nakamura I , Takahashi N , Sasaki T , et al . Wortmannin , a specific inhibitor of phosphatidylinositol-3 kinase , blocks osteoclastic bone resorption . FEBS Lett , 1995 , 361(1) :79-84.
 - [27] Sugatani T , Alvarez U , Hruska KA . PTEN regulates RANKL- and osteopontin-stimulated signal transduction during osteoclast differentiation and cell motility . J Biol Chem , 2003 , 278(7) :5001-5008.
 - [28] Takeshita S , Namba N , Zhao JJ , et al . SHIP-deficient mice are severely osteoporotic due to increased numbers of hyper-resorptive osteoclasts . Nat Med , 2002 , 8(9) :943-949.
 - [29] Takayanagi H . Mechanistic insight into osteoclast differentiation in osteoimmunology . J Mol Med , 2005 , 83(3) :170-179.
 - [30] Duran A , Serrano M , Leitges M , et al . The atypical PKC-interacting protein p 62 is an important mediator of RANK-activated osteoclastogenesis . Dev Cell , 2004 , 6(2) :303-309.
 - [31] Laurin N , Brown JP , Morissette J , et al . Recurrent mutation of the gene encoding sequestosome 1 (SQSTM1/p 62) in Paget disease of bone . Am J Hum Genet , 2002 , 70(6) :1582-1588.
 - [32] Lamothe B , Webster WK , Gopinathan A , et al . TRAF6 ubiquitin ligase is essential for RANKL signaling and osteoclast differentiation . Biochem Biophys Res Commun , 2007 , 359(4) :1044-1049.
 - [33] Takayanagi H , Ogasawara K , Hida S , et al . T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma . Nature , 2000 , 408(6812) :600-605.
 - [34] Fakrudin JM , Laurence J . HIV envelope gp120-mediated regulation of osteoclastogenesis via receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) secretion and its modulation by certain HIV protease inhibitors through interferon-gamma/RANKL cross-talk . J Biol Chem , 2003 , 278(48) :48251-48258.
 - [35] Takayanagi H , Kim S , Matsuo K , et al . RANKL maintains bone homeostasis through c-Fos-dependent induction of interferon-beta . Nature , 2002 , 416(6882) :744-749.
 - [36] Syed F , Khosla S . Mechanisms of sex steroid effects on bone . Biochem Biophys Res Commun , 2005 , 328(3) :688-696.
 - [37] Humphrey MB , Daws MR , Spusta SC , et al . TREM2 , a DAP 12-associated receptor , regulates osteoclast differentiation and function . J Bone Miner Res , 2006 , 21(2) :237-245.
 - [38] Candelieri GA , Glorieux FH , Prud'homme J , et al . Increased expression of the c-fos proto-oncogene in bone from patients with fibrous dysplasia . N Engl J Med , 1995 , 333(23) :1546-1551.
 - [39] Hamdy NA . Osteoprotegerin as a potential therapy for osteoporosis . Curr Rheumatol Rep , 2006 , 8(1) :50-54.

(收稿日期 : 2007-09-25)